

Identificación de *Cryptosporidium* en cerdos con enteritis*

Alicia Magdalena Nevárez Garza**

Rafael Ramírez Romero**

Rodolfo Niño Fong**

Luis Edgar Rodríguez Tovar**

Enrique Ramírez Bon***

Abstract

Numerous cryptosporidia were observed in the microvillous border of epithelial cells of the lower portion of the small intestine in three 10 week old piglets. These findings were associated with severe villous atrophy and mild lymphoid infiltration in the lamina propria. Furthermore, there was mild interstitial cuffing pneumonia compatible with *Mycoplasma* infection in all of these cases. Bacteriological studies were negative to *Salmonella*, enteropathogenic strains of *Escherichia coli* and *Pasteurella*. These pigs belonged to a crowded herd with bad sanitation, and were subjected to massive treatments with several antibiotics. Although a main pathological role of *Cryptosporidium* cannot be attributed in this study, this protozoal infection could be involved in the development of intestinal lesions. Cryptosporidiosis has been previously reported in calves in Mexico, but this is the first report in pigs.

Key words: *CRYPTOSPORIDIUM*, ELECTRONIC MICROSCOPY, INTESTINAL VILLOUS ATROPHY, IMMUNODEPRESSION.

Resumen

Se observaron numerosos *Cryptosporidium* en el borde ciliado de las células epiteliales del intestino delgado, en tres lechones de 10 semanas de edad. Estos hallazgos se asociaron con una severa atrofia de vellosidades y moderada infiltración linfóide en la lámina propia. Además, en todos estos casos hubo una severa neumonía intersticial y linfoproliferativa compatible con una infección por *Mycoplasma*. Los estudios bacteriológicos fueron negativos a cepas enteropatógenas de *Salmonella* y *Pasteurella*. Estos cerdos pertenecían a una piara con mala higiene y sujetos a masivos tratamientos con varios antibióticos. Aunque el principal papel patológico de *Cryptosporidium* no puede ser atribuido en éste, la infección por este protozoario podría estar involucrada en

Recibido el 25 de septiembre de 1996 y aceptado el 29 de enero de 1997.

* Parte de este trabajo fue presentado en forma de resumen en el X Encuentro de Investigación Biomédica, Monterrey, Nuevo León, México, octubre de 1992.

** Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Mederos, Monterrey, Nuevo León, 64930, México.

*** Departamento de Patología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Madero y calle Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Monterrey, Nuevo León, 64000, México.

el desarrollo de las lesiones. La cryptosporidiosis ha sido previamente notificada en becerros en México, pero este constituye el primer informe en cerdos.

Palabras clave: *CRYPTOSPORIDIUM*, ATROFIA DE LAS VELLOSIDADES INTESTINALES, INMUNODEPRESIÓN.

Las diarreas de origen infeccioso en animales recién nacidos son probablemente una de las condiciones patológicas que ocasionan más pérdidas económicas en la industria pecuaria. Una gran cantidad de agentes infecciosos, entre los que se incluyen bacterias, virus y parásitos, pueden estar involucrados en estos padecimientos. Los efectos de estos patógenos entéricos incluyen lesión intestinal severa, alteración en la actividad enzimática y alteraciones en el transporte de nutrimentos, los cuales pueden presentarse al mismo tiempo y causar clínicamente diarrea. Lo anterior hace difícil el diagnóstico etiológico de este síndrome y en muchos casos habrá que ponderar alguna de las etiologías incriminadas para establecer el diagnóstico integral.⁷

En los animales domésticos las infecciones naturales por *Cryptosporidium parvum* se presentan con alta morbilidad y eventualmente con diarreas en becerros, corderos y menos frecuentemente en lechones. Se ha considerado que la asociación de *Cryptosporidium* con otras infecciones bacterianas o virales puede provocar mortalidad.

Asimismo, las manifestaciones clínicas más graves de esta infección han sido asociadas con estados de inmunodeficiencia tanto en el hombre como en los animales. El género *Cryptosporidium* es el único incluido en la familia Cryptosporidiidae, la cual junto con las familias Sarcocystidae y Eimeriidae, constituyen el suborden Eimerina.^{1,7,12}

Estudios recientes, tanto en lechones gnotobióticos como en lechones mantenidos en condiciones convencionales, han constatado que la infección experimental por *Cryptosporidium parvum* es capaz de provocar lesiones in-

testinales y también alteraciones en las funciones digestivas del epitelio intestinal; en consecuencia, se desarrolla diarrea por mala absorción e hiperosmolaridad.^{1,12} Sin embargo, en cerdos mayores la infección por *Cryptosporidium* se considera asintomática y los animales que se recuperan desarrollan resistencia ante futuras infecciones.⁷ Considerando que la infección por *Cryptosporidium* ha sido descrita en México en becerros,⁶ pero no en cerdos, el objetivo del presente informe fue describir las características histológicas de las lesiones y la identificación ultraestructural de *Cryptosporidium* en cerdos con enteritis.

Animales

Se recibieron para diagnóstico tres cerdos híbridos con una edad aproximada de 10 semanas. Los animales fueron remitidos por considerarlos representativos de un brote de problemas respiratorios y diarreas, similar a otros problemas que se habían presentado con anterioridad en los lotes de destete y engorda en la misma granja; en los animales en cuestión se pudo constatar la presencia de diarrea y deshidratación. La granja de su procedencia se encargaba de confinar animales de diversos orígenes y tenía antecedentes de un deficiente manejo sanitario y hacinamiento; asimismo, se averiguó que a partir del destete los animales eran sujetos a un tratamiento prolongado con antibióticos (lincomicina entre ellos), administrados en el alimento por arriba de las recomendaciones terapéuticas. Lo anterior con la intención de disminuir la presentación de problemas de salud en los animales, particularmente salmonelosis y pasteurelosis, que habían sido clínicamente diagnosticadas en estos lotes.

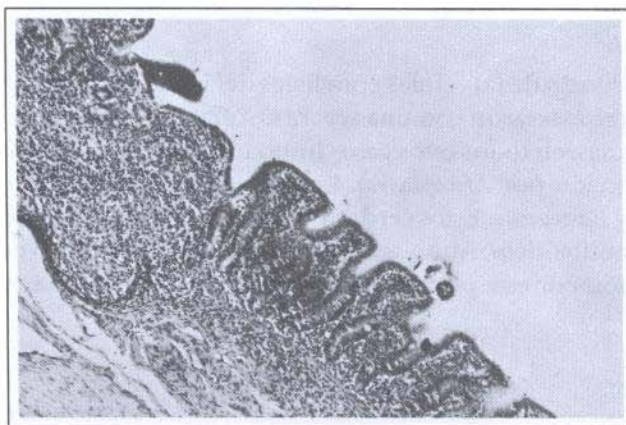


Figura 1. Intestino delgado; ileon. Se observa atrofia y fusión de las vellosidades intestinales. También infiltración linfocitaria en lámina propia e hiperplasia del epitelio de las criptas. La población de linfocitos en la placa de Peyer es escasa. H&E, 100X.

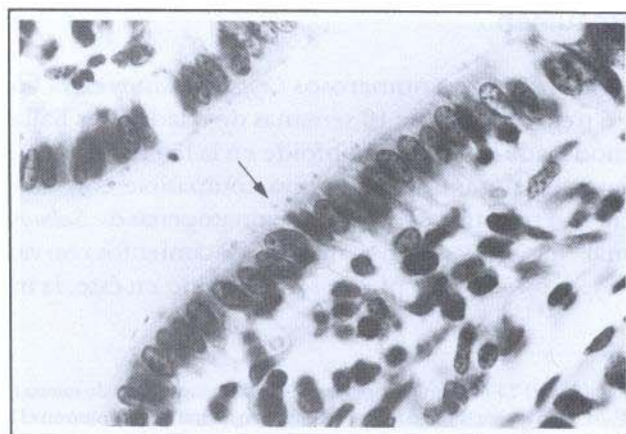


Figura 2. Ileon; epitelio de la vellosidad. Se aprecian múltiples protozoarios adheridos al vértice de las células, las cuales se observan con aspecto cuboidal. La infiltración inflamatoria en lámina propia es por linfocitos. H&E 1000X.

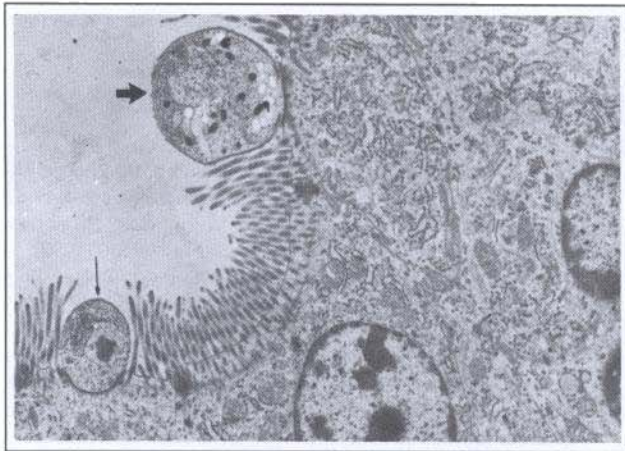


Figura 3. Íleon; confluencia de tres células epiteliales con cambios degenerativos. Se reconocen dos formas de evolución del protozoo; un trofozoito (flecha delgada) y un macrogameto (flecha gruesa) adheridos al vértice de las células. Nótese el desplazamiento de las vellosidades en los sitios de adhesión. Microscopio electrónico, 4,400X.



Figura 4. Íleon; sitio de adhesión del protozoo a la célula epitelial. Se reconoce al parásito protruyendo de la célula, envuelto por la vacuola parasitófora que le confiere localización intracelular-extracitoplásmica (la flecha señala la membrana plasmática de la célula epitelial parasitada). Microscopio electrónico, 20,000X.

Necropsia y estudios patológicos

Los animales fueron sacrificados con sobredosis de pentobarbital sódico y desangrados por sección de los vasos sanguíneos de ambas regiones axilares. En los tres cerdos las lesiones más importantes se observaron en el pulmón, apreciándose zonas de consolidación de color grisáceo en los lóbulos apicales y cardíaco con una extensión aproximada del 10% al 15%. En intestino no se reconocieron cambios significativos ni tampoco en los demás órganos. Se tomaron muestras de todos los tejidos para fijarlos en formalina amortiguada al 10% y subsecuentemente procesarlos por los métodos histológicos convencionales, incluyéndolos en parafina, seccionándolos a 5 mm y luego tiñéndolos con H&E.

Estudios bacteriológicos

Muestras obtenidas de intestino, ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y pulmón fueron sembradas en agar de Soya Trypticaseína* con 5% de sangre de borrego desfibrinada, agar Mac Conkey* y agar Verde Brillante.* Las muestras se incubaron por 48 horas a 37 °C y la identificación posterior se realizó con base en la literatura especializada.^{2,3} Subsecuentemente, los aislamientos de cepas de *Escherichia coli* fueron evaluados, mediante pruebas de aglutinación con sueros hiperinmunes de conejos, para determinar la presencia de antígenos de adherencia epitelial F4 y F5.¹⁰

Microscopía electrónica

Luego de la observación histopatológica se seleccionaron otras muestras de intestino, particularmente íleon, para microscopía electrónica. Las muestras fueron posfijadas en tetraóxido de osmio al 1% amortiguado, posteriormente deshidratadas con acetona e incluidas en Epon. Se realizaron cortes ultrafinos, los cuales fueron teñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo para observarse en un microscopio electrónico de transmisión.**

En los estudios bacteriológicos se notificó el aislamiento de cepas de *Escherichia coli*, negativas a la presencia de antígenos de adherencia epitelial (F4 y F5). Los estudios fueron negativos a la presencia de *Salmonella* y *Pasteurella*.

Microscópicamente las lesiones pulmonares correspondieron con una discreta neumonía intersticial de tipo linfoproliferativo compatible con una infección por *Mycoplasma*. Sin embargo, las lesiones histológicas más notorias se reconocieron en el intestino delgado, principalmente en íleon. En los tres casos se observó una severa atrofia y fusión de las vellosidades con hiperplasia en las criptas (Figura 1). Con mayor aumento se apreciaron numerosos cryptosporidiosis en diversos estadios de desarrollo, mayormente sobre el vértice de las vellosidades; las células parasitadas mostraban un aspecto cuboidal o columnar poco diferenciado (Figura 2). También se identificó un discreto infiltrado inflamatorio, mayormente linfocitos, en la lámina propia e hiperplasia del epitelio de las criptas.

Las observaciones con el microscopio electrónico de transmisión demostraron que las células epiteliales parasitadas se encontraban degeneradas, con el retículo endoplásmico dilatado y pérdida de la estructura mitocondrial. En los sitios de adhesión de los parásitos las microvellosidades eran escasas y desorganizadas (Figura 3). Asimismo, en estos sitios se observó una región densa en la zona inmediata interna de la membrana celular de

* Bioxon, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.

**Philips 301, Philips Electronic Instruments, The Netherlands.

la célula parasitada. Además, en la mayoría de los parásitos observados se pudieron constatar las elongaciones de la membrana celular envolviéndolos en la vacuola parasitófora (Figura 4).

En México no se había informado de la infección por *Cryptosporidium* en cerdos. En este caso, dadas las características de la lesión y la identificación de numerosos protozoarios, puede suponerse que la infección por *Cryptosporidium* tuvo un efecto significativo en el desarrollo de la lesión entérica. Estudios recientes han demostrado que *Cryptosporidium* es capaz de provocar notorias alteraciones en la estructura de las vellosidades intestinales, particularmente atrofiándolas y favoreciendo la infiltración de células inflamatorias en lamina propia.¹² Asimismo, las funciones del epitelio afectado se alteran, sobre todo se encuentra impedida la absorción electrogénica de glucosa estimulada por la absorción de sodio.^{1,12} Por otra parte, la función secretora de las células del epitelio de las criptas permanece sin cambios.¹² Estas alteraciones además de la creación de un ambiente de hiperosmolaridad intraluminal conducen al desarrollo de una diarrea que puede ser tan grave como para provocar la muerte.¹

Las manifestaciones patológicas de la cryptosporidiosis son más frecuentes en animales lactantes;⁷ aunque eventualmente los animales afectados se encuentran entre las 6 y 12 semanas de edad,^{8,9} como en el presente caso. Al respecto, es probable que otros factores predisponentes tales como el hacinamiento y las malas condiciones higiénicas en los corrales hayan favorecido la diseminación de la infección y en consecuencia la presentación de los signos clínicos. Por otra parte, el uso indiscriminado de antibióticos, pudo haber provocado un desbalance en la población microbiana intestinal^{4,5} y favorecer indirectamente el desarrollo de la cryptosporidiosis. Como se sabe, no existe un tratamiento efectivo contra esta parasitosis^{7,11} y la administración de fármacos antimicrobianos está contraindicada.¹¹

A pesar de que en el presente caso no se realizaron estudios específicos que descartaran la participación de alguna infección viral concomitante, la participación de coronavirus y rotavirus parece poco probable dada la edad de los animales afectados,^{13,14} además, durante los estudios de microscopía electrónica no se reconocieron evidencias de infección viral en las células epiteliales. Con base en lo anterior se sugiere considerar la participación de *Cryptosporidium* como un agente de importancia en el desarrollo del síndrome diarreico,

sobre todo si existen condiciones predisponentes que favorezcan la exacerbación de la infección.

Literatura citada

1. Argenzio, R.A., Liacos, J.A., Levy, M.L., Meuten, D.J., Lecce, J.G. and Powell, D.W.: Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration and impaired glucosa-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. *Gastroenterology*, 98: 1129-1140 (1990).
2. Carter, G.R.: Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 3rd ed. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1979.
3. Cowan, S.T. y Steel, K.J.: Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. 2a ed. CECSA, México, D.F., 1979.
4. Eisenstein, B.I.: Bacterial variation and antibiotic action. In: Advances in Internal Medicine. Vol. 26. Edited by: Stollerman, G.H., 393-426. Year Book Medical Publishers, Chicago, Illinois, 1980.
5. Freter, R.: Mechanisms of bacterial colonization of the mucosal surfaces of the gut. In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Edited by: Roth, J.A., 45-60. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1988.
6. González, M.C., Gómez, E.S. y Aluja, S.A.: Cryptosporidiosis en bovinos lactantes (histología, microscopía electrónica de transmisión y de barrido). *Vet. Méx.*, 14: 12-22 (1984).
7. Holland, R.E.: Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3: 345-375 (1990).
8. Lindsay, D.S. and Blagburn, B.L.: *Cryptosporidium parvum* infections of swine. *Compendium*, 13: 891-894 (1991).
9. Lindsay, D.S., Blagburn, B.L. and Stuart, B.P.: Coccidia and other protozoa. In: Diseases of Swine. 7th ed. Edited by: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J., 660-667. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1992.
10. Mills, K.W., Phillips, R.M., Kelly, B.S. and Baughman, G.L.: Using enzyme-linked immunosorbent assay to detect *Escherichia coli* K88 pili antigens from clinical isolates. *Am. J. vet. Res.*, 43: 365-367 (1982).
11. Moon, H.W. and Woodmansee, D.B.: Cryptosporidiosis. *J. Am. vet. med. Ass.*, 189: 643-646 (1986).
12. Moore, R., Tzipori, S., Griffiths, J.K., Johnson, K., Montigny de, L. and Lomakina, I.: Temporal changes in permeability and structure of piglet ileum after site-specific infection by *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology*, 108: 1030-1039 (1995).
13. Paul, P.S. and Stevenson, G.W.: Rotavirus and reovirus. In: Diseases of Swine. 7th ed. Edited by: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J., 331-348. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1992.
14. Saif, L.J. and Wesley, R.D.: Transmissible gastroenteritis. In: Diseases of Swine. 7th ed. Edited by: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J., 362-386. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1992.